



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) **EP 1 586 582 A1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
**19.10.2005 Patentblatt 2005/42**

(51) Int Cl.7: **C07K 14/025, A61K 47/48**

(21) Anmeldenummer: **05009073.7**

(22) Anmeldetag: **03.04.2000**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE**

- **Reiser, Christian**  
**96047 Bamberg (DE)**
- **Walter, Jürgen,Dr.**  
**69118 Heidelberg (DE)**

(30) Priorität: **10.04.1999 DE 19916224**

(74) Vertreter: **Gassner, Wolfgang**  
**Patentanwalt,**  
**Nägelsbachstrasse 49a**  
**91052 Erlangen (DE)**

(62) Dokumentnummer(n) der früheren Anmeldung(en)  
nach Art. 76 EPÜ:  
**00922458.5 / 1 173 475**

(71) Anmelder: **November Aktiengesellschaft**  
**Gesellschaft für Molekulare Medizin**  
**91056 Erlangen (DE)**

Bemerkungen:

This application was filed on 26 - 04 - 2005 as a  
divisional application to the application mentioned  
under INID code 62.

(72) Erfinder:  
• **Bertling, Wolf**  
**91056 Erlangen (DE)**

(54) **Fragmente des Virus Proteins 2 oder 3 des Polyomavirus als Fahren für Wirkstoffe**

(57) Die Erfindung betrifft ein synthetisches biologisch aktives Molekül zum Verankern eines Wirkstoffs am Virusprotein 1 (VP1) des Polyoma-Virus, wobei eine vom C-terminalen Ende des Virus Proteins 2 (VP2) bzw.

3 (VP3) des Polyoma-Virus abgeleitete Aminosäuresequenz A1 an ihrem einen Ende mit einem Wirkstoff verbunden ist.

**EP 1 586 582 A1**

## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft ein synthetisches biologisch aktives Molekül und ein Verfahren zu dessen Herstellung.

**[0002]** Aus Chen, X.S., Stehle, T., und Harrison, S.C. (1998): Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry, The EMBO Journal, Vol. 17, No. 12, pp. 3233-3240 sind die für eine Verankerung von den Virusproteinen VP2 bzw. VP3 des Polyomavirus am Virusprotein 1 verantwortlichen Wechselwirkungen bekannt. Danach erfolgt die Verankerung im Bereich des C-terminalen Endes des VP2 bzw. VP3.

**[0003]** Aus der US 4,950,599 ist es bekannt, dass das Polyomavirus zum Transport von Wirkstoffen in Zellen geeignet ist. Ferner ist es aus der DE 196 18 797 A1 bekannt, dass ein vom Polyomavirus abgeleitetes Kapsomer sich zum Transport von molekularer Substanz in Zellen eignet.

**[0004]** Aus der EP 0 259 149 A2 ist es bekannt, das innere Kapsidprotein VP6 aus Rotavirus als immunologisches Trägermolekül und als Vakzin zur Stimulierung der Immunantwort gegen Rotavirusinfektionen zu verwenden. Dabei werden immunogene Peptide über nicht näher definierte Peptid-Peptidwechselwirkungen an VP6 gebunden. VP6 bildet hier kein strukturiertes Kapsomer, sondern zeigt im Gegenteil einen ausgeprägten strukturellen Polymorphismus. Das VP6 liegt als Monomer oder in oligomerer Form vor. Es können sich aus oligomerem VP6 zwar Partikel bilden. Dabei handelt es sich jedoch nicht um ein Kapsid oder ein Kapsomer, sondern um ein unstrukturiertes Trägerprotein.

**[0005]** In Redmond, M.J. et al. (1991): Rotavirus particles function as immunological carriers for the delivery of peptides from infectious agents and endogenous proteins, Mol. Immunol. 28, 269-278 ist die Verwendung des inneren Kapsidproteins VP6 aus Rotavirus als Transportpartikel bekannt. Dabei ist das VP6 über ein von der Peptidsequenz des rotaviralen Proteins VP4 abgeleitetes Bindeprotein an immunogene Peptide oder Proteine gebunden. Ein an die von VP4 abgeleitete Peptidsequenz gekoppeltes Antigen befindet sich an der Außenseite des Transportpartikels und ist daher vor Abbau nicht geschützt.

**[0006]** In GB 22 57 431 A ist die Verwendung eines chimären Proteins beschrieben, das vom Hüllprotein des Phagen MS-2 abgeleitet ist. Dieses Protein kann Kapside bilden. Daran gekoppelte antigene Peptide oder dgl. sind an die Außenseite des Kapsids gebunden. Bei einer spontanen Assemblierung des chimären Proteins während der Expression in E.coli besteht ein hohes Kontaminationsrisiko durch bakterielle DNA oder Proteine.

**[0007]** Aus der DE 43 35 025 A1 ist ein endosomolytisch wirksames virusähnliches Partikel bekannt, das auf seiner äußeren Oberfläche mit membranaktiven Peptiden modifiziert ist. Die Herstellung dieses Partikels ist aufwendig.

**[0008]** Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere eine einfache Möglichkeit zur gezielten Assoziation von Wirkstoffen mit VP1 des Polyomavirus angegeben werden.

**[0009]** Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 8 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 7.

**[0010]** In der Beschreibung finden die folgenden Definitionen Anwendung:

**[0011]** Abgeleitete Aminosäuresequenz: Aminosäuresequenz, die gegenüber der Aminosäuresequenz, von der sie abgeleitet ist, unverändert ist oder sich davon durch Aminosäureaustausche, Insertionen oder Deletionen unterscheidet.

**[0012]** C-terminales Ende: Bereich oder Region am C-Terminus.

**[0013]** Synthetisches Molekül: Künstlich hergestelltes Molekül.

**[0014]** Koppeln bzw. Ankoppeln: Kovalentes oder nicht kovalentes Binden. Ein nicht kovalentes Binden kann z.B. über eine Chelat-Bindung erfolgen.

**[0015]** Gentechnik: Technik, die Verfahren zum Einbringen definierter Nukleinsäuren in Zellen umfaßt.

**[0016]** Nach Maßgabe der Erfindung ist ein synthetisches biologisch aktives Molekül vorgesehen, wobei eine vom C-terminalen Ende des Virus Proteins 2 (VP2) bzw. 3 (VP3) des Polyomavirus abgeleitete Aminosäuresequenz (A1) mit einem Wirkstoff verbunden ist.

**[0017]** Das vorgeschlagene synthetische biologisch aktive Molekül ermöglicht auf einfache Weise die gezielte Assoziation von Wirkstoffen mit VP1 des Polyomavirus. Dabei bildet sich ein strukturiertes Kapsomer aus. Unter Verwendung desselben ist eine einfache Herstellung von Kapsiden als universelle Träger für Wirkstoffe möglich.

**[0018]** Vorteilhafterweise besteht die Aminosäuresequenz (A1) aus 10 bis 55, vorzugsweise aus 28 bis 38, Aminosäuren. Die Beschränkung auf eine relativ kurze Aminosäuresequenz vereinfacht und verbilligt die Herstellung des synthetischen biologisch aktiven Moleküls.

**[0019]** Die Aminosäuresequenz entspricht zweckmäßigerweise zumindest abschnittsweise der VP2-Sequenz von der Aminosäureposition 250 bis 319, vorzugsweise von der Aminosäureposition 260 bis 300, besonders vorzugsweise von der Aminosäureposition 287 bis 297. Diese Aminosäuresequenz gewährleistet eine sichere Verankerung am VP1.

**[0020]** Beim synthetischen biologisch aktiven Molekül weist die Aminosäuresequenz (A1) vorzugsweise Aminosäuren in folgender Sequenz auf:

Trp Met Leu Pro Leu Ile Leu Gly Leu Tyr Gly

1

5

10

5

**[0021]** Der Wirkstoff ist vorzugsweise über einen Linker an die Aminosäuresequenz (A1) gebunden. Der Linker kann aus mindestens einer Aminosäure, einem Peptid, Protein, Lipid oder dgl. gebildet sein. Der Wirkstoff kann aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Nukleinsäure, Oligonukleotid, Protein, Peptid, peptidische Substanz, PNA, Modifikationen der genannten Substanzen und niedermolekulare pharmazeutische Wirkstoffe. Geeignet sind insbesondere solche Wirkstoffe, welche über eine der unten erwähnten reaktiven Gruppen an die Aminosäuresequenz ankoppeln.

10

**[0022]** Das synthetische biologisch aktive Molekül kann gekoppelt an eine von VP1 des Polyomavirus abgeleitete Aminosäuresequenz vorliegen und/oder Bestandteil eines Medikaments sein.

15

**[0023]** Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen synthetischen biologisch aktiven Moleküls mit folgenden Schritten vorgesehen:

a) Bereitstellen einer vom C-terminalen Ende des Virus Proteins 2 (VP2) bzw. 3 (VP3) des Polyomavirus abgeleiteten Aminosäuresequenz (A1), wobei die Aminosäuresequenz (A1) ein Mittel zum Ankoppeln aufweist und

20

b) Binden des Wirkstoffs über das Mittel zum Ankoppeln an die Aminosäuresequenz (A1).

**[0024]** Das Mittel zum Ankoppeln kann als Aminosäure Glycin, Cystein oder über Lysin gebundenes Glycin aufweisen. Vorteilhafterweise ist das Mittel zum Ankoppeln eine an das N- oder C-terminale Ende der Aminosäuresequenz (A1) gebundene weitere, vorzugsweise synthetisch hergestellte, Aminosäuresequenz (A2).

25

**[0025]** Das synthetische biologisch aktive Molekül kann, zumindest teilweise, gentechnisch hergestellt werden. Dabei kann die Aminosäuresequenz (A1), die weitere Aminosäuresequenz (A2) und der Wirkstoff ganz oder teilweise gentechnisch hergestellt sein. Die weitere Aminosäuresequenz (A2) weist zweckmäßigerweise Glycine und/oder Aminosäuren mit funktionellen Seitengruppen auf, wobei die funktionellen Seitengruppen aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein können: Amino-, Sulfhydryl-, Carboxyl-, Hydroxyl-, Guanidinium-, Phenyl-, Indol-, Imidazol-Rest.

30

**[0026]** Das Mittel zum Ankoppeln kann eine über eine Aminosäure, vorzugsweise Glycin, Cystein oder über Lysin gebundenes Glycin, an das C- oder N-terminale Ende der Aminosäuresequenz (A1) gebundene reaktive Gruppe sein. Sie kann einen der folgenden Bestandteile aufweisen: Aminosäure mit Monobromacetylrest, Aminosäure mit Monochloracetylrest, Aminosäure mit 3-Nitro-2-Pyridinsulfonylrest (Npys). Die vorgeschlagenen reaktiven Gruppen sind universell einsetzbar. Sie eignen sich zum Ankoppeln einer Vielzahl von Wirkstoffen.

35

**[0027]** Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, dass der Wirkstoff über eine Thioether- oder Disulfidbrückenbindung an die Aminosäuresequenz (A1) oder an die weitere Aminosäuresequenz (A2) gebunden wird. Die Herstellung einer solchen Bindung läßt sich in der Praxis einfach bewerkstelligen. Selbstverständlich ist auch die Verwendung anderer reaktiver Gruppen denkbar. Z.B. kommt N-Succinimidyl Bromacetat oder N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) in Betracht.

40

**[0028]** Der Wirkstoff kann über einen Linker an die Aminosäuresequenz (A1) oder die weitere Aminosäuresequenz (A2) gebunden werden. Der Linker kann aus mindestens einer Aminosäure, einem Peptid, Protein, Lipid oder dgl. gebildet sein.

45

**[0029]** Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen synthetischen biologisch aktiven Moleküls mit folgenden Schritten vorgesehen:

aa) Synthetisieren einer vom C-terminalen Ende des Virus Proteins 2 (VP2) bzw. 3 (VP3) des Polyomavirus abgeleiteten Aminosäuresequenz (A1) und

bb) Ankoppeln und Synthetisieren eines Wirkstoffs, nämlich eines Peptids, an die Aminosäuresequenz (A1),

50

wobei die Schritte lit. aa und lit. bb mittels Peptidsynthese oder mittels gentechnischer Methoden durchgeführt werden.

**[0030]** Beim Schritt lit. bb wird die Aminosäuresequenz (A1) um den Wirkstoff verlängert. Die Verlängerung bzw. das Ankoppeln des Wirkstoffs erfolgt durch fortgesetztes Ankoppeln von Aminosäureresten. Dieses Verfahren läßt sich besonders einfach durchführen.

55

**[0031]** Weitere beide vorgenannten Verfahren betreffende vorteilhafte Ausgestaltungen sind aus den Unteransprüchen ersichtlich.



**[0042]** Wahlweise läßt sich die Konjugationsreaktion auch unter folgenden Bedingungen durchführen. Das monochloracetylierte Ankerpeptid und ein Peptid mit endständiger SH-Gruppe werden in 1-Methyl-2-pyrrolidon in Gegenwart eines etwa 10-fachen Überschusses an Diisopropylethylamin und eines ca. 5-fachen Überschusses Tributylphosphin bei RT inkubiert. Nach der Reaktion wird H<sub>2</sub>O zugefügt und das Produkt durch Zugabe von Ether präzipitiert und durch Gelfiltration aufgereinigt (Defoort, J.P., Nardelli, B., Huang, W. und Tam, J.P.(1992) Int. J. Protein Res. 40, 214-221).

**[0043]** Wahlweise läßt sich die Konjugationsreaktion auch folgendermaßen durchführen. Das die SH-Gruppe enthaltende Peptid wird in 0.2 M Phosphatpuffer, 10 mM EDTA, pH 7.4 gelöst. Hierzu wird das in Dimethylformamid gelöste Monochloracetylmodifizierte Ankerpeptid gegeben. Nach der Reaktion erfolgt die Aufreinigung durch Gelfiltration oder RP-HPLC (Zhang, L. und Tam, J.P. (1997) J. Am. Chem. Soc. 119, 2363-2370).

**[0044]** Zur Herstellung von isolierten VP1 Pentameren wird VP1 in E.coli als rekombinantes Protein mit einem N-terminalen 6 x Histidin Affinitäts-Tag (=His-Tag) exprimiert. Das Protein wird über eine Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt.

**[0045]** Der His-Tag wird durch eine Faktor Xa-Behandlung entfernt. Das Protein wird in einem SDS-PAGE-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

**[0046]** Dieses Ausgangsmaterial (VP1-Protein in 20mM HEPES, pH 7,3, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin) wird in centricon 100 (Amincon) konzentriert und über FPLC-Gelfiltration (Superdex 200) mit einem Laufpuffer (50 mM Tris, 0,15 M NaCl, 5 mM EDTA, pH 8,5) in die hochmolekulare Kapsidfraktion und die Pentamer-Untereinheiten (Molekulargewicht: etwa 225 kD) getrennt. Beide Fraktionen werden in centricon 100 konzentriert. Iodacetamid (SIGMA) wird in einem 10-fach molaren Überschuss zu der die Pentamere enthaltenden Lösung gegeben, um potentiell reaktive SH-Gruppen zu blockieren. Die Reaktion erfolgt für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Die modifizierte Pentamerfraktion wird über Gel-Filtration von überschüssigem Iodacetamid getrennt. Mit Hilfe von VP1 spezifischen Antikörpern und einer Affinitätsmatrix (Protein A Support der Firma BIO-RAD) werden VP1-spezifische monoklonale Antikörper adsorbiert. Mit der Antikörper-beschichteten Matrix wird die gereinigte Pentamerfraktion präzipitiert. In einem weiteren Inkubationsschritt wird die Pentamer-Matrix mit der Ankersequenz versetzt. Die Proben werden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel (12.5%) analysiert.

#### Konjugatbildung zwischen Npys-modifiziertem Anker-Peptid und Peptid mit endständigem Cystein:

**[0047]** Wahlweise kann neben der Reaktion zwischen einem monochlor- oder monobromacetyliertem Ankerpeptid und einem Peptid mit endständigem Cystein unter Ausbildung eines Thioethers die Konjugatbildung zwischen Ankerpeptid und Peptidsequenz auch über die 3-Nitro-2-pyridinsulfonyl(=Npys) Gruppe an einem endständigen Cystein des Ankers und einer SH-Gruppe des zu koppelnden Peptids erfolgen. Statt eines monochloracetylierten Glycin wird hierzu ein Npys-modifiziertes Cystein an die Ankersequenz N-terminal gekoppelt. Dabei handelt es sich um ein sogenanntes aktiviertes Disulfid, welches in der Lage ist mit Thiolen, wie z.B. Cysteinen, unter Bildung eines unsymmetrischen Disulfids zu reagieren. Dabei kommt es zur Abspaltung von 3-Nitro-2-thiopyridon, dessen UV Maximum bei 329 nm eine spektroskopische Untersuchung der Kinetik der Reaktion zwischen beiden Verbindungen gestattet.

**[0048]** Für die Reaktion werden folgende Bedingungen gewählt (Albericio, F., Andreu, D., Giralt, E., Navalpotro, C., Pedrosa, E., Ponsati, B. und Ruiz-Gayo, M. (1989) Int. J. Peptide Res. 34, 124-128). Das in 0.1 M Natriumacetat, 0.1 M Natriumchlorid, pH 4.5 gelöste zu koppelnde Peptid mit endständiger SH-Gruppe wird mit dem Npys-modifizierten Peptid versetzt, anschließend der pH auf 5.0 eingestellt und für mindestens 12 h unter Rühren inkubiert. Danach wird der pH durch Zugabe von 1N NaOH auf 7.0 eingestellt und nochmals 3 h inkubiert. Nach der Reaktion wird der Ansatz gegen 10 mM NaHCO<sub>3</sub> dialysiert.

**[0049]** Die Reaktion läuft optimal in einem pH Bereich zwischen 4.5 und 7.0 ab. Diese Bedingungen gewährleisten eine Minimierung unerwünschter Nebenreaktionen, wie z.B. die Ausbildung von symmetrischen Disulfiden zwischen den zu koppelnden Peptidmolekülen oder eine Abspaltung der Npys-Gruppe. Das Npysmodifizierte Peptid sollte bei der Reaktion im Überschuß gegenüber dem zu konjugierenden Peptid vorliegen (Albericio, F., Andreu, D., Giralt, E., Navalpotro, C., Pedrosa, E., Ponsati, B. und Ruiz-Gayo, M. (1989) Int. J. Peptide Res. 34, 124-128).

**[0050]** Beispiele der Erfindung sind in den folgenden Sequenzprotokollen dargestellt:

**[0051]** Das Sequenzprotokoll 1 zeigt eine von VP2 des Polyomavirus, Position 287-297, abgeleitete Aminosäuresequenz. Sie dient im synthetischen biologisch aktiven Molekül als Anker zum Verankern des Wirkstoffs am VP1.

**[0052]** Das Sequenzprotokoll 2 zeigt ein erstes Ausführungsbeispiel eines synthetischen biologisch aktiven Moleküls. Die vom HIV-1 abgeleitete Peptidsequenz entspricht den Positionen 1-21; die als Anker wirkende angekoppelte Aminosäuresequenz besetzt die Positionen 22-33. Sie ist vom VP2 des Polyomavirus abgeleitet.

**[0053]** Im Sequenzprotokoll 3 ist ein weiteres Beispiel für eine als Anker geeignete Aminosäuresequenz gezeigt.

**[0054]** Das Sequenzprotokoll 4 zeigt die Sequenz des VP2 vom Polyomavirus. Daraus sind die als Anker geeigneten Sequenzen zwischen den Positionen 250 und 300 ersichtlich.

**[0055]** In den Sequenzprotokollen 5 und 6 sind weitere synthetische biologisch aktive Moleküle gezeigt. Sie können

## EP 1 586 582 A1

mit VP1 des Polyomavirus gekoppelt und anschließend zur Behandlung einer HIV-Infektion in die infizierten Zellen eingeschleust werden.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 1 586 582 A1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> november Aktiengesellschaft Gesellschaft für molekulare Medizin  
5 <120> Synthetisches biologisch aktives Molekuel  
<130> 401043GA  
<140>  
<141>  
10 <150> DE 199 16 224.7  
<151> 1999-04-10  
<160> 6  
<170> PatentIn Ver. 2.1  
15 <210> 1  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Polyomavirus sp.  
<220>  
20 <222> (287) ... (297)  
<223> Sequenz aus VP2  
<400> 1  
Trp Met Leu Pro Leu Ile Leu Gly Leu Tyr Gly  
1 5 10  
25 <210> 2  
<211> 33  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
30 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Aminosäuren 1-21 RT  
aus HIV-1; Aminosäuren 22-33 VP2-Sequenz aus Polyomavirus  
<400> 2  
Leu Ala Glu Asn Arg Glu Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr  
1 5 10 15  
35 Tyr Asp Pro Ser Lys Pro Asp Trp Met Leu Pro Leu Ile Leu Gly Leu  
20 25 30  
Tyr  
40 <210> 3  
<211> 34  
<212> PRT  
<213> Polyomavirus sp.  
<220>  
45 <222> (263) ... (296)  
<223> Sequenz aus VP2  
<400> 3  
Gln Asp Glu Ser Gly Glu Val Ile Lys Phe Tyr Gln Ala Gln Val Val  
1 5 10 15  
50 Ser His Gln Arg Val Thr Pro Asp Trp Met Leu Pro Leu Ile Leu Gly  
20 25 30  
Leu Tyr  
55 <210> 4  
<211> 319  
<212> PRT  
<213> Polyomavirus sp.

EP 1 586 582 A1

<220>  
 <222> (1) ... (319)  
 <223> Vollständige Sequenz von VP2

5 <400> 4  
 Met Gly Ala Ala Leu Thr Ile Leu Val Asp Leu Ile Glu Gly Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Glu Val Ser Thr Leu Thr Gly Leu Ser Ala Glu Ala Ile Leu Ser Gly  
 20 25 30  
 10 Glu Ala Leu Ala Ala Leu Asp Gly Glu Ile Thr Ala Leu Thr Leu Glu  
 35 40 45  
 Gly Val Met Ser Ser Glu Thr Ala Leu Ala Thr Met Gly Ile Ser Glu  
 50 55 60  
 15 Glu Val Tyr Gly Phe Val Ser Thr Val Pro Val Phe Val Ser Arg Thr  
 65 70 75 80  
 Ala Gly Ala Ile Trp Leu Met Gln Thr Val Gln Gly Ala Ser Thr Ile  
 85 90 95  
 Ser Leu Gly Ile Gln Arg Tyr Leu His Asn Glu Glu Val Pro Thr Val  
 100 105 110  
 20 Asn Arg Asn Met Ala Leu Ile Pro Trp Arg Asp Pro Ala Leu Leu Asp  
 115 120 125  
 Ile Tyr Phe Pro Gly Val Asn Gln Phe Ala His Ala Leu Asn Val Val  
 130 135 140  
 25 His Asp Trp Gly His Gly Leu Leu His Ser Val Gly Arg Tyr Val Trp  
 145 150 155 160  
 Gln Met Val Val Gln Glu Thr Gln His Arg Leu Glu Gly Ala Val Arg  
 165 170 175  
 30 Glu Leu Thr Val Arg Gln Thr His Thr Phe Leu Asp Gly Leu Ala Arg  
 180 185 190  
 Leu Leu Glu Asn Thr Arg Trp Val Val Ser Asn Ala Pro Gln Ser Ala  
 195 200 205  
 Ile Asp Ala Ile Asn Arg Gly Ala Ser Ser Ala Ser Ser Gly Tyr Ser  
 210 215 220  
 35 Ser Leu Ser Asp Tyr Tyr Arg Gln Leu Gly Leu Asn Pro Pro Gln Arg  
 225 230 235 240  
 Arg Ala Leu Phe Asn Arg Ile Glu Gly Ser Met Gly Asn Gly Gly Pro  
 245 250 255  
 40 Thr Pro Ala Ala His Ile Gln Asp Glu Ser Gly Glu Val Ile Lys Phe  
 260 265 270  
 Tyr Gln Ala Gln Val Val Ser His Gln Arg Val Thr Pro Asp Trp Met  
 275 280 285  
 45 Leu Pro Leu Ile Leu Gly Leu Tyr Gly Asp Ile Thr Pro Thr Trp Ala  
 290 295 300  
 Thr Val Ile Glu Glu Asp Gly Pro Gln Lys Lys Lys Arg Arg Leu  
 305 310 315

50 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Aminosäuren 1-20 RT  
 55 aus HIV-1 (Accession Nummer AJ006287) und ein  
 zusaetzliches C-terminales Cys



## EP 1 586 582 A1

7. Kapsid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das synthetische biologisch aktive Molekül an eine von VP1 des Polyomavirus abgeleitete Aminosäuresequenz gekoppelt ist.

5 8. Verwendung von VP1 des Polyomavirus gekoppelt mit einem synthetischen biologisch aktiven Molekül, gebildet aus einem Wirkstoff und einer vom C-terminalen Ende des Virus Proteins 2 (VP2) bzw. 3 (VP3) des Polyomavirus abgeleiteten Aminosäuresequenz (A1), wobei an die Aminosäuresequenz (A1) der Wirkstoff gebunden ist, so dass  
10 der Wirkstoff mittels der Aminosäuresequenz (A1) mit dem Virus Protein 1 (VP1) des Polyomavirus unter Ausbildung eines strukturierten Kapsomers assoziierbar ist, zum Einschleusen des synthetischen biologisch aktiven Moleküls in Zellen, wobei jedes Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers und jedes Diagnostizierverfahren, welches am menschlichen oder tierischen Körper vor-  
genommen wird, ausgenommen ist.

15

20

25

30

35

40

45

50

55



Europäisches  
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 05 00 9073

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
D,A	X.S. CHENG ET AL.: "Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry" EMBO JOURNAL, Bd. 17, Nr. 12, 15. Juni 1998 (1998-06-15), Seiten 3233-3240, XP002147347 EYNHAM, OXFORD GB * Seite 3237, linke Spalte, Absatz 2 - Seite 3238, rechte Spalte, Absatz 2; Abbildung 4 *	1	C07K14/025 A61K47/48
A	WO 96/11274 A (US HEALTH) 18. April 1996 (1996-04-18) * Seite 4, Zeile 4 - Seite 5, Zeile 21; Ansprüche; Beispiele *	1,6	
A	DE 195 43 553 A (DEUTSCHES PRIMATENZENTRUM GMBH) 28. Mai 1997 (1997-05-28) * Seite 2, Zeile 5 - Zeile 9 * * Seite 2, Zeile 58 - Seite 3, Zeile 13; Ansprüche; Beispiele *	1,6	
A	WO 94/04686 A (BARSOUM JAMES G ;BIOGEN INC (US); FAWELL STEPHEN E (US); PEPINSKY) 3. März 1994 (1994-03-03) * Seite 5, Zeile 13 - Seite 7, Zeile 19; Ansprüche; Beispiele *	1,6	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7) C07K A61K
2	Recherchenort Den Haag	Abschlußdatum der Recherche 12. August 2005	Prüfer Fuhr, C
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument ..... & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03 82 (P04C03)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 05 00 9073

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

12-08-2005

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9611274	A	18-04-1996	US 5618536 A	08-04-1997
			AT 258985 T	15-02-2004
			AU 3828495 A	02-05-1996
			AU 717647 B2	30-03-2000
			AU 4447899 A	28-10-1999
			CA 2201601 C	01-08-2000
			DE 69532532 D1	11-03-2004
			DE 69532532 T2	05-01-2005
			DK 789766 T3	24-05-2004
			EP 1018555 A2	12-07-2000
			EP 0789766 A1	20-08-1997
			ES 2213754 T3	01-09-2004
			JP 3343912 B2	11-11-2002
			JP 10506796 T	07-07-1998
			JP 2002053597 A	19-02-2002
			PT 789766 T	31-05-2004
			US 2005100556 A1	12-05-2005
			WO 9611274 A1	18-04-1996
			US 2003170271 A1	11-09-2003
			US 2004132162 A1	08-07-2004
US 5855891 A	05-01-1999			
US 2002164350 A1	07-11-2002			
DE 19543553	A	28-05-1997	DE 19543553 A1	28-05-1997
			AT 288489 T	15-02-2005
			CA 2236159 A1	29-05-1997
			DE 59611189 D1	10-03-2005
			DK 862633 T3	30-05-2005
			WO 9719174 A1	29-05-1997
			EP 0862633 A1	09-09-1998
			ES 2237778 T3	01-08-2005
			JP 2000500973 T	02-02-2000
			US 6238859 B1	29-05-2001
WO 9404686	A	03-03-1994	AT 173016 T	15-11-1998
			AU 667244 B2	14-03-1996
			AU 5083293 A	15-03-1994
			CA 2135642 A1	03-03-1994
			DE 69321962 D1	10-12-1998
			DE 69321962 T2	01-07-1999
			DE 656950 T1	14-03-1996
			DK 656950 T3	19-07-1999
			EP 0656950 A1	14-06-1995
			EP 0903408 A2	24-03-1999
			ES 2123062 T3	01-01-1999
			FI 945248 A	05-01-1995

EPO FORM P4481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 05 00 9073

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

12-08-2005

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9404686 A		HK 1012678 A1	15-09-2000
		JP 2869396 B2	10-03-1999
		JP 10033186 A	10-02-1998
		JP 2702285 B2	21-01-1998
		JP 7503617 T	20-04-1995
		KR 153027 B1	15-10-1998
		NO 944273 A	17-02-1995
		NZ 255831 A	24-04-1997
		WO 9404686 A1	03-03-1994
		US 6316003 B1	13-11-2001
		US 5674980 A	07-10-1997
		US 5670617 A	23-09-1997
		US 5652122 A	29-07-1997
		US 5747641 A	05-05-1998
-----			

EPO FORM P0481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82